

30/529482

MAR 2005

PCT/JP 2004/005994

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26. 4. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 2 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 2 4 0 4 9
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 2 4 0 4 9]

REC'D 01 JUL 2004

WIPO

PCT

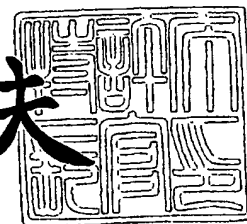
出 願 人 松下電器産業株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 6 月 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 4 7 6 2 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 2033740416

【提出日】 平成15年 4月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61J 1/05

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 平塚 淳典

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 江本 文昭

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 宮地 寿明

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100097445

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩橋 文雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100103355

【弁理士】

【氏名又は名称】 坂口 智康

【選任した代理人】

【識別番号】 100109667

【弁理士】

【氏名又は名称】 内藤 浩樹

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011305

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809938

【書類名】 明細書

【発明の名称】 フィルターとそれを備えたバイオセンサ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基板と前記基板上に試料導入路を構成する空間とを備え、前記基板上の前記空間に少なくとも 1 つ以上の柱状構造物を有することを特徴とするフィルター。

【請求項 2】 請求項 1 記載の柱状構造物と隣り合う他の柱状構造物との間隔が $0.1\ \mu\text{m}$ 以上 $2\ \mu\text{m}$ 以下である事を特徴とするフィルター。

【請求項 3】 請求項 1 記載の柱状構造物の折り返し間隔が $2\ \mu\text{m}$ 以上 $10\ \mu\text{m}$ 未満である事を特徴とするフィルター。

【請求項 4】 基板と前記基板上に試料導入路を構成する空間とを備え、基板上の前記空間に少なくとも 1 以上の柱状構造物を備える前記基板と前記基板上に試料導入口と試料導入路と前記試料導入路内に設けた酵素を含む試薬とを備えたバイオセンサであり、前記柱状構造物は前記試料導入口と前記試薬との間にあることを特徴とするフィルターを備えたバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、化学および生化学分野の臨床試験方法に使用するデバイスで、そのデバイスによる血液分離方法および分離装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

血液中の成分を測定する生化学検査は各種の診断、観察に広く利用され、臨床検査として重要な検査法となっている。そして各種の生化学検査装置が開発され多数の検体や検査項目が分析されるようになった。しかし血液中の成分、特に血球成分は、測定装置の値に高いバックグラウンドを生じるか、または測定装置の性能を妨害するため、サンプル中の血球成分の除去が望まれる。また検査装置は多くの場合、少量のサンプル量で測定可能な事が望まれる。

【0003】

少量の血液を利用して血球成分の除去を行う方法や装置として、サンプル導入法として毛管現象を利用し、内部に多数の欠けた月や弾丸形の障害物を配置した血球成分分離構造物がある（例えば、特許文献1参照）。

【0004】

【特許文献1】

特開2001-183363号公報

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

現在、代表的血糖センサの必要サンプル容量は $0.3 \sim 4 \mu\text{l}$ である。一方、前期従来 of 分離構造物ではサンプル容量が $20 \sim 50 \mu\text{l}$ 必要である。この事は、測定には極微量のサンプル量しか必要でないにもかかわらず血球ろ過には多量のサンプルが必要であり、ろ過に必要なサンプル量を少なくしなければならないという課題を有していた。

【0006】

また、血糖センサの代表的な大きさが幅6mm、長さ10mmであるが、前記従来 of 分離構造物では、血球移動遅延の効果で血球ろ過を行っているため、流路長を長くする必要がある、流路である毛管経路の幅が $2 \sim 5 \text{ mm}$ 、長さが70mm程度必要となる。そのためデバイスのサイズが大きくなり、前記の血糖センサに利用する事が困難であるという課題を有していた。

【0007】

本発明は、前記従来 of 課題を解決するもので、必要とされるサンプル量が少なく、全体の形状が小さいバイオセンサを提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

前記従来 of 課題を解決するために、本発明のフィルターは基板と前記基板上に試料導入路を構成する空間とを備え、前記基板上の前記空間に少なくとも1つ以上の柱状構造物を有することを特徴とする。

【0009】

また、本発明のフィルターを備えたバイオセンサは基板と前記基板上に試料導

入路を構成する空間とを備え、基板上の前記空間に少なくとも1以上の柱状構造物を備える前記基板と前記基板上に試料導入口と試料導入路と前記試料導入路内に設けた酵素を含む試薬とを備えたバイオセンサであり、前記柱状構造物は前記試料導入口と前記試薬との間にあることを特徴とする。

【0010】

【発明の実施の形態】

(実施の形態1)

本発明の血液における、血球と血漿を分離するフィルターとバイオセンサは微細な柱状構造物が一つ以上並べられた構造をしており、血液の血漿成分はその構造物の隙間空間を通過させ、血球は空間を通過させない。本構成によって血液中の血漿と血球を分離することができる。本実施の形態で述べるフィルターとは柱状構造物が1つ以上あり、血球を通過させない機能を持つものをいう。

【0011】

血球を通過させず、血漿だけを通過させるためには柱状構造物と隣り合う他の柱状構造物との間隙を最適化することから可能とする。またろ過サンプル量は流路の深さを最適化することから可能とする。さらに血漿ろ過効率、必要サンプル量、そして全体の形状は柱状構造物の配置や折り返し間隔を最適化することから最良の値が得られる。

【0012】

本構成によって、微量サンプル量で、小さな形状で、短時間で血球と血漿を分離する事が可能なフィルターとそれを用いたバイオセンサを提供することができる。

【0013】

(実施の形態2)

図1は本発明のフィルターを備えたバイオセンサである。採取した血液において血球と血漿を分離するフィルターと、バイオセンサとの構成を示す略図である。基板8上に柱状構造物9を備え、前記柱状構造物9は試料導入路11上にある。さらに作用極2、対極6、試薬7は前記柱状構造物9の後ろに位置する。さらに基板8上には作用極のリード3、対極のリード5が形成されている。

【0014】

基板8は信越シリコン社製シリコン基板（P型、100面、直径100mm、厚さ525 μ m、抵抗率10～20 $\Omega \cdot \text{cm}$ ）であり、その上に柱状構造物9が作製されている。基板8に半導体加工により柱状構造物9を作製し、次にシリコン基板表面に絶縁膜を成膜した後、作用極2，対極6からなる電極を作製している。この基板8を樹脂製シートからなるカバー12と重ね合わせ、蓋をする事でバイオセンサを作製した。

【0015】

基板8とカバー12の両端に空気抜き溝4が形成され貫通孔が作製され、穴の広い口が試料導入口10、穴の狭い口が空気抜き口となる。また電極と電極の間に試薬層が形成され血漿内の測定対象物が測定される。

【0016】

上記方法で得られたバイオセンサは、その大きさが長さ9mm、幅5mmであり、流路サイズは幅1.5mm、長さ7.0mm、深さ3 μ mであり、必要とされるサンプル必要量は31.5n1未満となる。

【0017】

以上説明したように、本発明のバイオセンサはサンプル量が従来より少なくなるものを提供する。

【0018】

本実施の形態のバイオセンサは、入口と出口とを有する基板上の両端にそれぞれ、血液用と血漿用の液だめが形成され、液だめをつなぐように極微小の柱状構造物が多数形成されたフィルターが配置形成されている。

【0019】

好適な実施態様では本発明の血漿分離フィルターはヘマトクリット値が40から60である血液を毛管現象により入口から輸送される。輸送された血液成分は多数形成させた柱状構造物で血球が塞ぎ止められ、残りの血漿が出口に形成された血漿用の液だめに導入される。血液導入時、及び導入後の血球は溶血されていない。

【0020】

図2は本発明の柱状構造物を具備した基板の拡大図である。同図-1)はその俯瞰を示し、同図-2)柱状構造物の上面からの拡大図である。矢印は試料が侵入する方向を示す。

【0021】

柱状構造物は、以下の特性を有する。

【0022】

(1) 柱状構造物と隣り合う他の柱状構造物との間隔は、図2の図番15に示したように、間隔 α と定義する。

【0023】

(2) 柱状構造物は、図1、図2に示したように、折り返しに配置されている。

【0024】

(3) 柱状構造物の折り返し間隔は図2の図番14に示したように、折り返し間隔 β と定義する。

【0025】

デバイス上に形成させてある柱状構造物の間隔 α に血球を塞き止めることからフィルターとしての機能を付与させている。血球の断面積が $2\mu\text{m}$ 、また直径が $8\mu\text{m}$ 程度である事から、(表1)に示したように、間隔 α を $0.1\mu\text{m}$ 以上、 $2\mu\text{m}$ 以下にすると血球を塞き止め、血漿が流れやすくなる。

【0026】

【表1】

柱状構造物間隔(α)	8	4	2.2	2.0	1.8	1.6	1	0.3	0.1	0.05
血球塞き止め	×	×	×	○	○	○	○	○	○	×

数値の単位: μm

シンボルの説明: ○: 塞き止めを確認、×: 塞き止めを確認できず

【0027】

この構造が血漿を通過させるが血球は通過さないことで血漿と血球の分離を行っているが、同時に間隔 α に血球が入り込み「目詰まり」が発生する。そのため

血漿が分離されずに血球と同じ場所に留まり、血漿の分離効率が悪くなる。この現象を回避するために柱状構造物の配置を図1、図2の図番9のように限られた空間内で折り返し構造とした。この事からデバイスサイズを大きくすること無く、また短時間で多くの血液と接触させ、血球の塞き止めと血漿の通過を行わせる事を可能とした。また限られた空間内で折り返し回数が多くなるとろ過効率が向上する。

【0028】

一方、折り返し間隔を血球の大きさである $2\mu\text{m}$ 以下に配置した場合、折り返し内部に血球が入ることが不可能となり逆に血漿分離効率は悪くなる。そのため折り返し間隔 β の間隔は $2\mu\text{m}$ 以上 $10\mu\text{m}$ 未満とする事が最良のろ過効率を与える事となる。さらに、好ましくは $2\mu\text{m}$ から $8\mu\text{m}$ の範囲である。最良の分離効率を与えるのは、血球が一行に並ぶことであり、そのためには、血球の大きさ $8\mu\text{m}$ 以下であることが必要である。

【0029】

なお、折り返し形状に配置した一つ以上の柱状構造物を有する。柱状構造物は断面形状が四角や丸等、どのような形状であっても構わない。

【0030】

(実施の形態3)

・作製したバイオセンサを用いた血液の血漿分離
本発明に基づくフィルターをシリコン基板上へ作製し、血液の血漿分離を観測した。

【0031】

図2-1) と共に作製手順を説明する。柱状構造物9はシリコンからなる基板13を反応性イオンエッチングにより構築した。さらに柱状構造物9を形成したシリコン基板に酸化被膜(図示せず)を形成した。大きさは実施の形態2で述べたとおりである。本実施の形態では、血液の血球と血漿の分離を評価するものであるため、電極などは作製していない。本実施の形態で得られたフィルターをここではデバイスと呼ぶ。

【0032】

評価手順は以下の通りである。最初にデバイスを顕微鏡のステージに乗せ、デバイスの溝の一端に試料としての血液を滴下し液体の変化を記録した。液体が移動する様子を図3に示す。写真において矢印は血液が移動する方向を示す。それぞれの写真は左の黒がフィルター部、右の明るい部分がフィルター部を通過した後の流路部を示している。血液は毛管現象により写真の左から右へと移動する。

【0033】

試料導入前の写真は血液導入前のデバイスの状態を示している。血液を入れると同時に入口の液だめに血液が充填され、続けてフィルター部内に充填された。

【0034】

試料導入後の写真は、ろ過された透明な血漿がフィルター部から流路へと流れ出した様子を示している。写真に示す境界線は血液から血球が分離され、血漿のみが流れる境界である。血液導入から血漿ろ過完了までに要した時間は25秒以内であった。このようにして効率的に血液中の血球と血漿を分離する事が可能となった。

【0035】

(実施の形態4)

・グルコース濃度の測定

図4は血液中のグルコース濃度 $87 \sim 648 \text{ mg/dl}$ におけるバイオセンサ感度を比較したものである。同図において黒三角は標準液を、黒四角は本発明のフィルターを備えたバイオセンサ、黒菱形はフィルターを備えていないバイオセンサでの計測データを示す。

【0036】

グルコース濃度の異なる血液の調製は、血液（ヘマトクリット値：44）にグルコース溶液を所定量添加することで行った。ヘマトクリットとは血液中の血球と血漿の比率をさす。標準液はリン酸緩衝生理食塩水にグルコースを溶解した。

【0037】

図1と共にバイオセンサの作製手順を説明する。実施の形態3において作製したデバイスに作用極2、対極6、ならびに作用極のリード3、対極のリード5を形成した。また、試薬7としてグルコースオキシダーゼを作用極2と対極6の間

に設置した。なおグルコースオキシダーゼは酵素反応が起こると発生した電子を電流として計測できるように、反応時に作用極 2、対極 6 が血漿を介して導通する位置に設置した。

【0038】

電流値は試料導入口から血液を導入し、25秒後に作用極のリードと対極のリードに0.5Vの電圧を印加した。その5秒後に計測を行った。

【0039】

フィルターありのデバイスでの応答は、フィルターなしのデバイスの応答よりも約20パーセント応答値が上昇し、グルコース標準液の応答値により近づいた。この事から感度が向上した事が分かる。

【0040】

(実施の形態5)

・コレステロール濃度の測定

図5は血液中のコレステロール濃度113～288mg/dlにおけるバイオセンサ応答を比較したものである。同図において黒菱形は本発明のフィルターを備えたバイオセンサであり、黒四角はフィルターを備えていないバイオセンサである。

【0041】

コレステロールの異なる血液は、全血を遠心分離で血漿を取り除いた後、高コレステロール値をもつ標準血清（セラクリアーLP 異常域、アズウェル製）を添加することで行った。

【0042】

フィルター付けていないのバイオセンサでは血球が妨害物質として作用し、コレステロール濃度に比例した電流値が得られず、測定不能となっていたものが、フィルターを付けたバイオセンサの場合はコレステロール濃度に依存した値が測定された。この事からフィルター付のデバイスを使用することによりはじめて測定可能となった事が分かる。

【0043】

なお、本実施の形態では試薬としてコレステロールエステラーゼを用いた。

【 0 0 4 4 】

【発明の効果】

本発明により、微量サンプル量で、小さな形状で、短時間で血球と血漿を分離する事が可能なフィルターとそれを用いたバイオセンサを提供することを目的として、幅 5 mm、長さ 9 mm 程度の極小のバイオセンサを作製した。このバイオセンサ 30 nL 程度の極微量の血液を血漿と血球に分離可能となる。また、本発明のデバイスは半導体加工技術を利用して作製されており、大量の基板をまとめて作製することができる。つまり、均質な基板を、容易に大量生産できる産業上も有用な技術である。このように血球と血漿の分離フィルターはバイオセンサや DNA 診断等の臨床検査の前処理デバイスとして最適である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のバイオセンサの概略を示す図

【図 2】

本発明の柱状構造物を具備した基板のフィルター部を拡大した図

【図 3】

本発明のフィルターにより血液のろ過状態を示す図

【図 4】

本発明のバイオセンサによるグルコースの応答値変化を示す図

【図 5】

本発明のバイオセンサによるコレステロールの応答値変化を示す図

【符号の説明】

- 1 スペーサ
- 2 作用極
- 3 作用極のリード
- 4 空気抜きの溝
- 5 対極のリード
- 6 対極
- 7 試薬

8, 13 基板

9, 16 柱状構造物

10 試料導入口

11 試料導入路

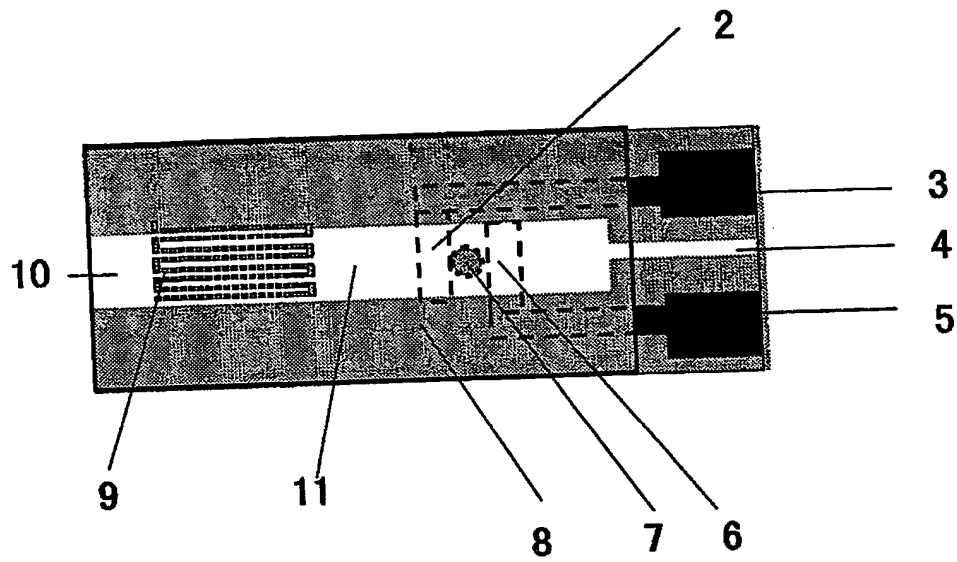
12 カバー

14 柱状構造物の折り返し間隔 (β)

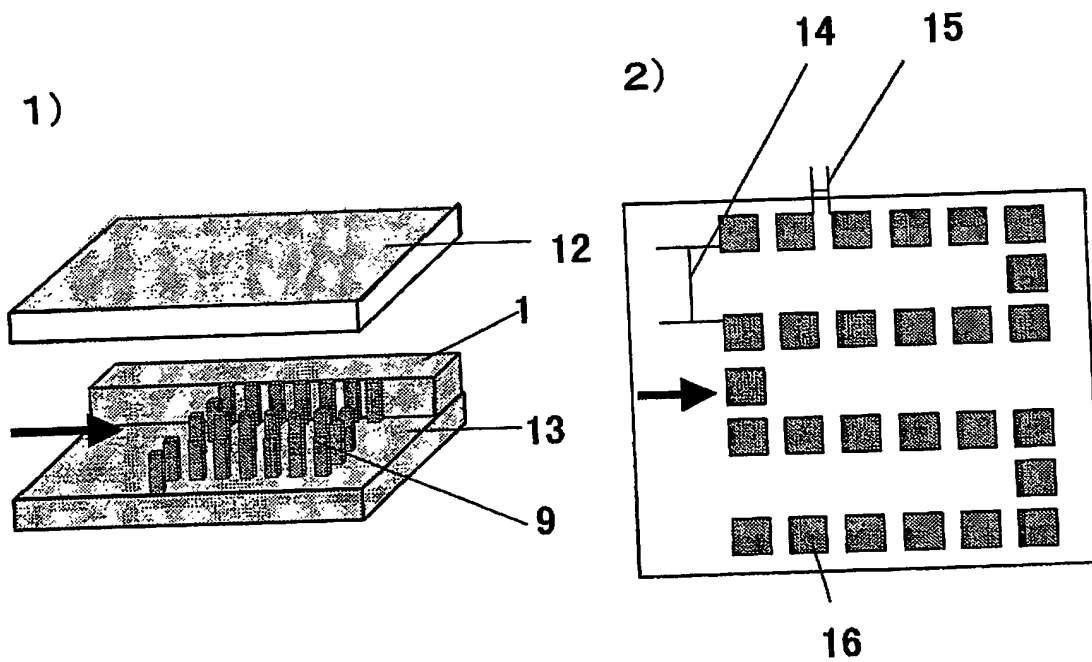
15 柱状構造物と隣り合う他の柱状構造物の間隔 (α)

【書類名】 図面

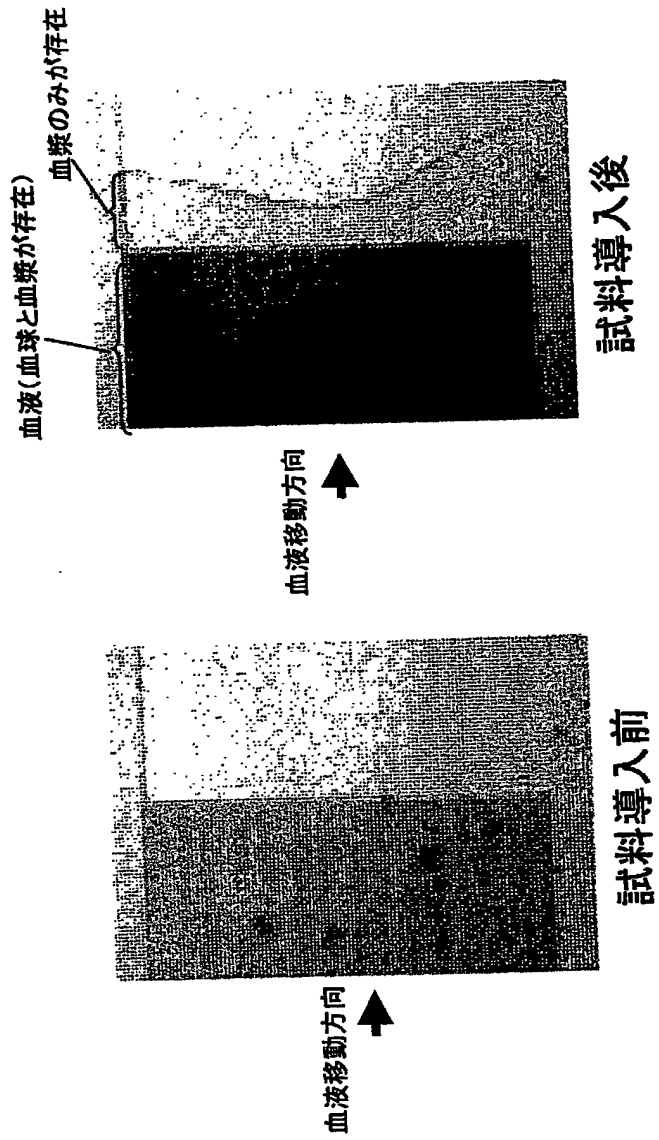
【図 1】



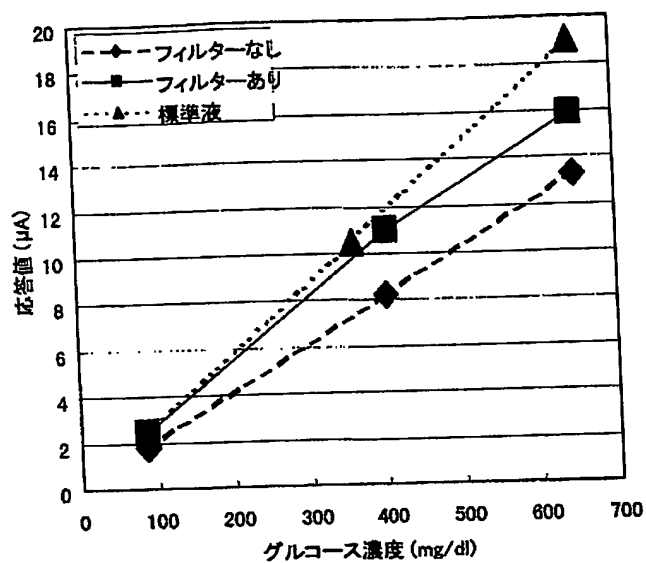
【図 2】



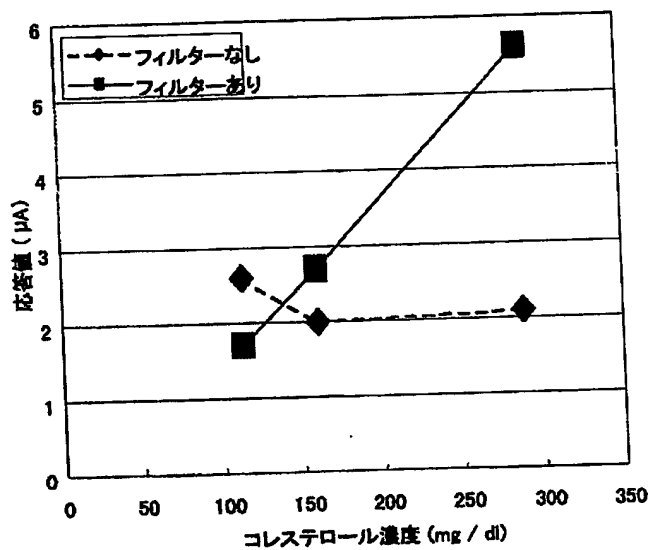
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 極微量の血液を短時間で、分離可能なフィルター及びそれを用いたバイオセンサを提供すること。

【解決手段】 基板上には流路が作製されており、流路内には折りたたみ構造を持つフィルター構造物、バイオセンサ用の試薬、作用極、そして対極が作製されている。そして基板上部がカバーで張り合わされ毛細管現象で血液が吸引されるためのキャビティが形成されている。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 3 - 1 2 4 0 4 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 8 2 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

氏 名

松下電器産業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.